

## 研究ノート

## 乳癌細胞でのカリウムチャネルに関する電気生理学的検討

土 田 勝 晴

同志社女子大学  
薬学部・医療薬学科  
教授

## Abstract

Potassium channels are considered as key molecules in the progression of several cancer types. Human ether a go-go (hEAG) potassium channels have been reported to possess oncogenic properties and to regulate the cell cycle. The present study was designed to elucidate the physiological manifestation of the potassium channel in one of breast cancer cell lines called HCC1937 by using the patch clamp technique. The outward currents were elicited by the depolarizing clamp pulses in MCF-7. On the other hand, the similar outward currents were not elicited in HCC1937 cells. The present results revealed that the voltage-dependent potassium channels seemed not to be abundantly populated in HCC1937 compared with MCF-7. Therefore, it can be considered that the degree of the potassium channel contribution to proliferation and/or the type of potassium channels associated with proliferation varies among different cell lines of breast cancer.

## 諸 言

細胞膜上で行われるイオン輸送は生命活動に必須なものであり、それを司るイオンチャネルは、細胞膜を貫通して、イオンを選択的に透過する膜たんぱく質である。カリウムイオンチャネルを抑制すると、細胞増殖が抑制される現象が見出されている<sup>1)</sup>。悪性腫瘍細胞においてもカリウムチャネル発現増加が報告されており、human ether a go-go (hEAG)  $K^+$  チャネルの発現が、乳がん、脳神経、皮膚、軟性がん、結腸および子宮頸がん細胞で報告されている<sup>2-6)</sup>。乳癌細胞である MCF-7 細胞系において、種々のカリウムチャネルの活性変動は細胞増殖や細胞周期と連動しており、ATP-dependent  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$ )、hEAG、human intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -

activated  $K^+$  channel (hIK<sub>Ca</sub>) の活性増大、delayed rectifier  $K^+$  channel の Kv1.1 の減少が報告されているが、一方 large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel (BK<sub>Ca</sub>) は不変との報告もある<sup>3, 7-9)</sup>。また MCF-7 ではカリウムチャネル遺伝子、たんぱく質の量的変化も報告されている<sup>8, 10)</sup>。カリウムチャネルは細胞膜の静止電位の形成や再分極に大きく関わり、このチャネルの抑制は細胞膜の脱分極をもたらす。カリウムチャネルの活性化は、細胞膜の過分極をもたらし、電気化学的勾配の増大で  $Ca^{2+}$  の流入量を増加させ、細胞増殖に影響を与えると考えられている<sup>11-13)</sup>。このカリウムチャネル変化が乳がん細胞で普遍的に観察されるか否かを検討する目的で HCC1937 細胞を用いて、パッチクランプ法を適用しカリウム電流を測定した<sup>15)</sup>。本研究では特に、細胞に特異的に発現しているとされている hEAG チャネルに焦点をあてて実験を行った<sup>16)</sup>。

## 実験材料及び実験方法

実験には HCC1937 に p53 を導入した高橋らの細胞、及び MFC-7 (ATCC) を使用し、培地には、RPMI1460 と 10% FBS を用いた。ホールセルでの膜電流の測定には、パッチクランプ装置を使用し、ピペット内液 (mM) としては、130 KCl、10 EGTA、10 HEPES、2 MgCl (pH7.4)、外液 (mM) としては、137 NaCl、4KCl、1.8 CaCl<sub>2</sub>、1 MgCl<sub>2</sub>、11 Glucose、10 HEPES (pH7.4) の溶液を用い 20-24℃ の室温で実験を行った。ただし外液成分の Na,K を 96mM KCl、45mMNaCl に置換した実験も行った。ボルテージクランプの刺激条件としては、下記の通りである。

IV パルス実験：[ I ] 保持電位 = -100mV、1<sup>st</sup> パルス = -40 ~ +80mV、1 秒間、2<sup>nd</sup> パルス = -60mV、1 秒間、刺激間隔 = 15 秒間、[ II ] 保持電位 = -100mV、1<sup>st</sup> パルス = +50 (または +60) mV、1~2 秒間、2<sup>nd</sup> パルス = -20 ~ -120mV、1 秒間、刺激間隔 = 15 秒間

Ramp パルス実験：保持電位 = 0mV、Ramp 0 ~ -120mV (2 秒間)、-120 ~ +60mV (7 秒間)、+60 ~ 0mV (2 秒間)、刺激間隔 = 15 秒間

## 結 果

細胞の継代は 1 週間に 1 回の割合で行った。MFC-7 に比較して、HCC1937 細胞では増殖スピードはやや遅かった。図 1A、B に IV パルスでの HCC1937 細胞での膜電流記録を示す。1A では、保持電位 -100mV から -40 ~ +80mV への脱分極パルスでもほとんど外向き電流は観察されず、-60 mV へのクランプバックでの Tail 電流も観察されなかった。1B では外向き電流は観察されたが、Tail 電流は極めて小さかった。1C では保持電位 -100mV から +50mV へ脱分極し、そのあと -20 ~ -120mV へクランプバックした際の Tail 電流は観察されず、したがって Tail 電流の逆転電位を測定することはできなかった。一方、1D に示すように外液 K<sup>+</sup> 濃度を 96mM に増大させた記録

においては、+60mV の脱分極から、-120mV へのクランプバックで、小さいながらもゆっくりと脱活性化する内向き電流が認められた。+80mV への脱分極時の細胞あたりの外向き電流値は HCC1937 で  $0.18 \pm 0.06\text{nA}$  (n=4)、MFC-7 で  $0.50 \pm 0.13\text{nA}$  (n=3) (Mean  $\pm$  SEM、 $p < 0.05$ , Student t-test) であった。図 2 に HCC1937 細胞で Ramp 波によりクランプした際の結果を示した。ランプ波でも電流波形で著明な外向き電流は認められなかった。図 1A、B と同一実験条件での MFC-7 の膜電流記録を、図 3A、B に示した。MFC-7 では 1st パルスで活性化される外向き電流が観察された。ただし Tail 電流は観察されなかった。

## 考 察

本実験の結果、MFC-7 細胞では、脱分極パルスにより外向き電流が観察されたものの、HCC1937 細胞では 4 例中 1 例を除き大きな外向き電流は観察されず、MCF-7 に比べ有意に小さかった。膜容量の測定は行っていないので、表面積補正はなされていず、厳密には言い難いものの、HCC1937 細胞では電流特性を薬理的に詳しく解析するには電流量は小さすぎるといったものであった。一方 K<sup>+</sup> 電流をより観察しやすい実験条件の外液 K<sup>+</sup> 濃度を 96mM に増大させた記録において、+60mV の脱分極から、-120mV へのクランプバックで、小さいながら緩徐に脱活性化する内向き電流が認められた (図 1D)。この電流が、hEAG と遅延整流性電流 (delayed rectifier) である可能性はあるが、これも更なる解析を行うには小さすぎると言える<sup>17)</sup>。本実験においては、既に報告のある MCF-7 細胞で認められた外向き電流に対しては、詳しい解析は行わなかった。今回の実験でみられた MFC-7 の電流波形は、脱分極パルス後半部分での不活性化されていない成分に関しては、hEAG 電流と類同の電流と判断されるが<sup>13, 14)</sup>、時間的に不活性化する遅延整流性カリウム電流が、混在している可能性もある。<sup>17)</sup> 実験手法的には、MCF-7 細胞と比較し

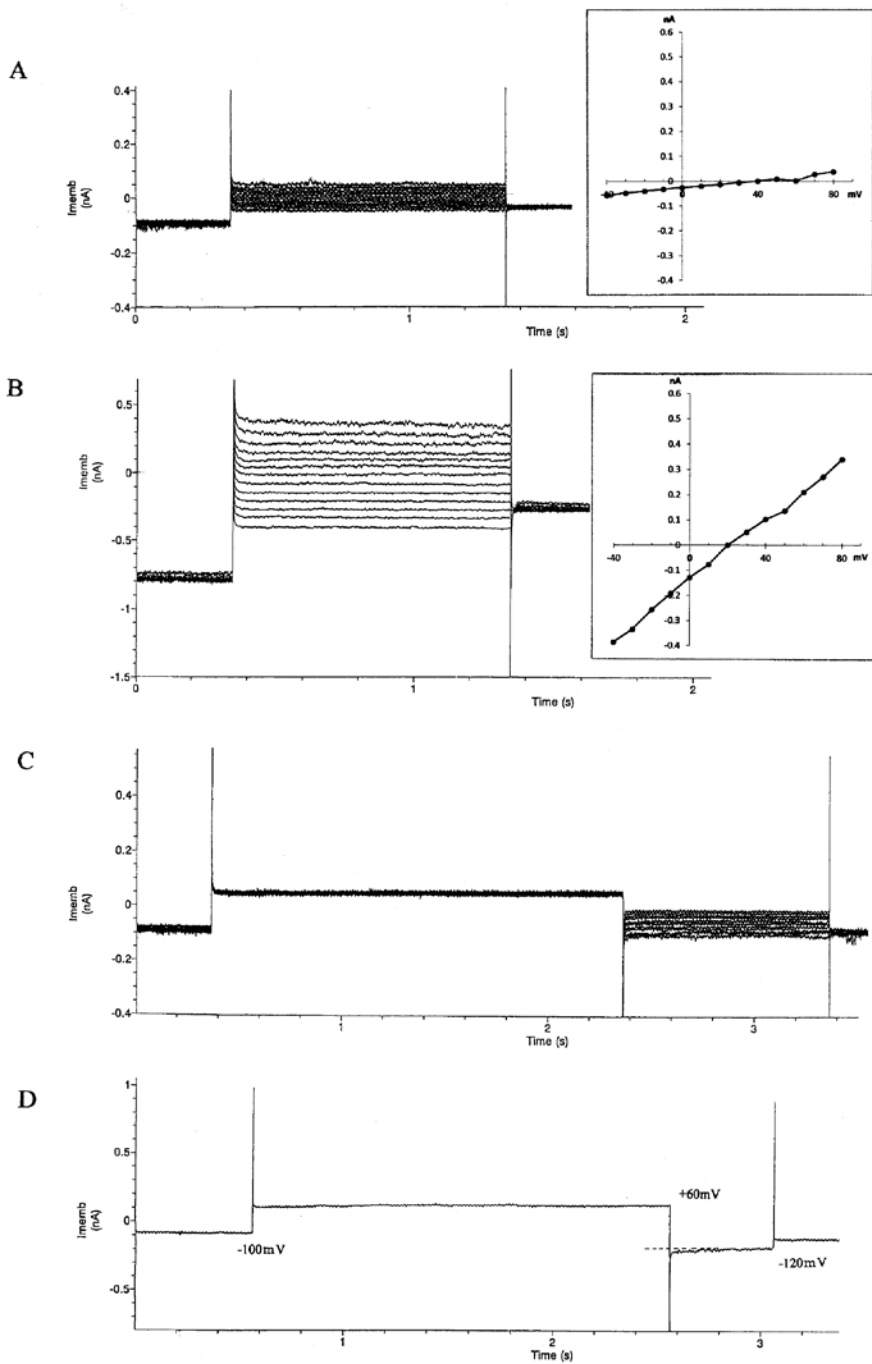


図 1. HCC1937 細胞のパッチクランプ記録

A、B：IV パルス [I] による、4 例中の典型例 2 例の電流波形と脱分極パルス最後での IV カーブ（右図の□内）を示す。

C、D：IV パルス [II] による 3 例中の典型例 2 例の電流波形を示す。D のみ外液 K 濃度は 96mM に設定してある。

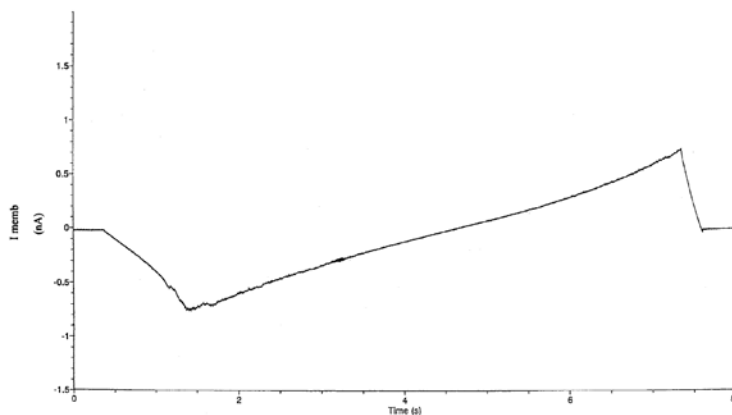


図 2. HCC1937 細胞での Ramp 波による膜電流記録

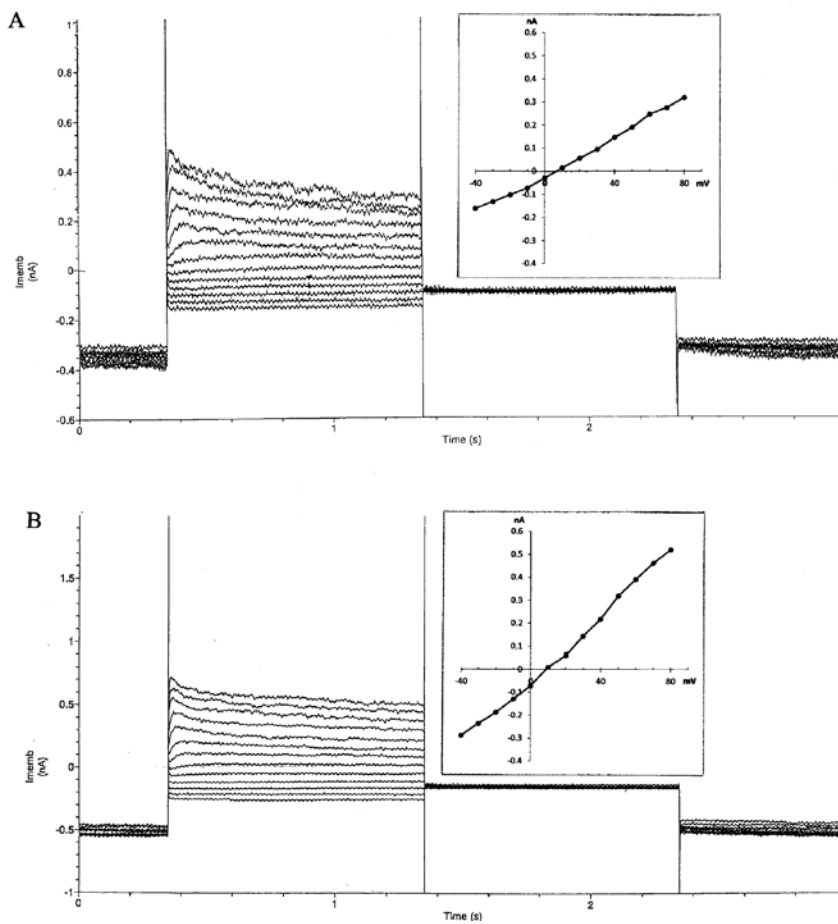


図 3. MFC-7 細胞のバッチクランプ記録

A、B：IVパルス [I] による、3 例中の典型例 2 例の電流波形と脱分極パルス最後での IV カーブ（右図の□内）を示す。

て、HCC1937 細胞でのシールの上がりが悪く成功率が低く、ホールセルパッチクランプ法での長時間の記録は困難であった。そのため、HCC1937 細胞では、多数例のデータ取得は難しく、内在性の他のカリウム電流の検討までには至らなかった。シールの上がり難さから判断すると、HCC1937 では、MFC-7 細胞とは細胞膜の表面形態に差があるのかもしれない。既に報告されている研究結果によれば、様々な癌細胞で G1 相初期には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は低く<sup>18)</sup>、細胞膜は脱分極した状態にあり<sup>1)</sup>、その後、hEAG, hIK<sub>Ca</sub> および K<sub>ATP</sub> 電流の増大が G1 相から S 相の間に認められ、それによる過分極に伴い電気化学的勾配が増加して、細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$  が流入して  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は上昇すると報告されている<sup>8, 12)</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  はカルモジュリン (CaM) を介して腫瘍細胞増殖に関与すると報告されている<sup>19)</sup>。薬理的にみると、MCF-7 細胞ではカリウムチャンネル阻害作用のあるテトラエチルアンモニウム (TEA)、アステミゾール、siRNA の適用で G1 相から S 期への進入が抑制され、更に S 期にある細胞はそこで停止するという<sup>8, 12)</sup>。MCF-7 細胞では、特に hEAG チャンネルの阻害により、60% の増殖抑制が認められるとの報告もある<sup>8)</sup>。また CaM 拮抗薬で増殖が阻害され、G1 期に留まる細胞が増えると言う<sup>20)</sup>。本実験では、電流を記録した HCC1937 細胞が細胞周期のどこに存在したかは明確に断言できないが、HCC1937 細胞の膜電流を測定に供した細胞が比較的大きく、細胞膜の輪郭がはっきりしていたため、おそらく間期の G1-S-G2 期と考えられる。以上の結果から HCC1937 細胞では、hEAG 様のカリウムチャンネルの増殖への関与は少ないかほとんどないと考えられる。寄与の度合いの大きな hEAG カリウムチャンネルの発現が低ければ、細胞膜は過分極を起こしにくく、それが細胞膜の電気化学的勾配を低下させ、 $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入が減少して、癌細胞増殖を抑制すると考えられる。しかし、がん細胞には K<sub>ATP</sub>、hIK<sub>Ca</sub>、Kv1.1、Kv1.3 等の多様なカリウムチャンネルが

発現していることから、他のカリウムチャンネルによって細胞周期が影響されている可能性があり、今後の検討課題である。

#### 引用文献

- 1) Wonderlin WF, Strobl JS (1996) Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* 154:91-107
- 2) Meyer R, Schonherr R, Gavrilo-Ruch O et al. (1999) Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J Membr Biol* 171: 107-115
- 3) Quadid-Ahidouch H, Le Bourhis X, Roudbaraki M et al. (2001) Changes in the K<sup>+</sup> current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K<sup>+</sup> channel. *Receptors Channels* 7: 345-356
- 4) Fari LM, Ocana DB, Diaz L et al. (2004) Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res* 64: 6996-7001
- 5) Heemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F et al. (2006) Overexpression of Eag 1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* 5: 41
- 6) Ousingsawat J, Spitzner M, Puntheeranurak S et al. (2007) Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 824-831
- 7) Quadid-Ahidouch H, Chaussade F, Roudbaraki M et al. (2000) Kv1.1 K channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 272-277
- 8) Quadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Delcourt P et al. (2004) Functional and molecular identification of intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated K<sup>+</sup> channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol* 287: C125—C134
- 9) Quadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Ahidouch A (2004) Cell-cycle-dependent expres-

- sion of the large  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 244-251
- 10) Roy J, Vantol B, Coeley EA et al. (2008) Pharmacological separation of hEAG and hERG  $\text{K}^{+}$  channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Oncology Reports* 19: 1551-1516
  - 11) Nilius B, Wohlrab W (1992) Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol* 445: 537-548
  - 12) Quadid-Ahidouch H, Ahidouch A (2008)  $\text{K}^{+}$  channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr Biol* 221: 1-6
  - 13) Borowiec A-S, Hague F, Harir N et al. (2007) IGF-1 activates hEAG  $\text{K}^{+}$  channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: role in cell proliferation. *J Cell Physiol* 212: 690-701
  - 14) Gavrilova-Ruch O, Schonherr K, Gessner G et al. (2002) Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol* 188: 137-149
  - 15) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100
  - 16) Pardo L, del Camino D, Sanchez A et al. (1999) Oncogenic potential of EAG  $\text{K}^{+}$  channel. *EMBO J* 18:5540-5547
  - 17) Meyer R, Heinemann SH (1998) Characterization of an eag-like potassium channel in neuroblastoma cells. *J Physiol* 508:49-56
  - 18) Pande G, Kumar NA, Manogaran PS (1996) Flow cytometric study of changes in the intracellular calcium during the cell cycle. *Cytometry* 24:55-63
  - 19) Etindi R, Manni A (1992)  $\text{TNF-}\alpha$  and IGF-I effects on calcium ion transients in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 66: 131-137
  - 20) Strobl JS, Wonderlin WF, Flynn DC (1995) Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen Pharmacol* 26: 1643-1649

#### 謝辞

HCC1937細胞の提供を受けた、本学薬物治療学研究室、高橋玲教授、伊佐みゆき研究員並びに、創薬理論科学研究室、高瀬晶子研究員、日本新薬株式会社研究所、林誠治主任研究員、朝倉圭一研究員のご支援ご協力に感謝申し上げます。

本研究は 2010 年度研究助成金を用いて実施された。